

氏 名 山下 裕樹

授与した学位 博 士

専攻分野の名称 農 学

学位授与番号 博甲第3662号

学位授与の日付 平成20年 3月25日

学位授与の要件 自然科学研究科バイオサイエンス専攻

(学位規則第5条第1項該当)

学位論文の題目 レトロトランスポゾンによる品種識別DNAマーカーの開発とサツマイモ活動型レトロトランスポゾンを利用した「正の遺伝学」解析手法へのアプローチ

論文審査委員 教授 田原 誠 教授 加藤 鎌司 教授 一瀬 勇規

学位論文内容の要旨

レトロトランスポゾン (RTNs) は、植物、哺乳類を含む真核生物に普遍的に存在する転移因子で、「動く遺伝子」と呼ばれる。転移は、転写した自身の配列を逆転写してゲノムに挿入することで生じるので、真核生物のゲノムには多数の複製配列が存在する。しかし、ほとんどの複製配列は進化の過程で転移能力を失っており、実験的に転移を確認できたものは、高等植物ではわずかに数例でしかない。本学術論文のための研究では、転移活性を持つ活動型RTNsを発見し、利用することにより、1) アズキ[*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]品種識別DNAマーカーの開発、2) サツマイモ[*Ipomoea batatas*(L.)Lam.]の活動型RTNsの転移誘導による遺伝子機能同定法(「正の遺伝学」解析手法)の開発に取り組んだ。

RTNsを用いたアズキ品種識別DNAマーカー開発

RTNsのうち、LTR(Long Terminal Repeat)型の*copia*と*gypsy*、non-LTR型のLINE(Long Interspersed Nuclear Element)の配列保存性の高い部分にプライマーを設計して、アズキのゲノムからPCRによりRTNsを網羅的に単離した。単離した配列のうち、転写活性が認められたSGr7とPHAREの2種類について、DNAサブトラクション法により、マーカー開発が必要な品種に特異性の高い挿入部位を調査した。その結果、「きたのおとめ」に高度に特異的なPHARE1の挿入部位を同定した。この挿入部位をPCRマーカー化し、北海道立農業試験場が保有する国内外のアズキ遺伝資源について調査したところ、「きたのおとめ」の育成に用いられた在来系統など、極めて限られた国内の在来系統にのみ存在する挿入であり、「きたのおとめ」固有マーカーとして、加工製品においてもその混入を高感度に検出することが可能となった。

活動型RTNsを用いた「正の遺伝学」解析手法の確立を目指して

サツマイモにおいて見出した活動型LINEである*Lib*は、茎頂部の培養でも転移することを示した。しかし、サツマイモでは茎頂培養による*Lib*の転移頻度は極めて低いことが判明したため、遺伝子組換えによって*Lib*をタバコ(*Nicotiana tabacum* L.)とタルウマゴヤシ(*Medicago truncatula* Gaertn.)に導入し、形質転換個体を茎頂培養することで、1) *Lib*の転移を誘導する、2) 培養に伴うゲノム変異を最小化して遺伝子の変異を*Lib*の転移・挿入に限定することで、表現型の変異と*Lib*の転移が直結する「正の遺伝学」解析手法の確立を目指した。また、サツマイモの活動型LTR-RTNsである *Rtsp-1*とEM配列も*Lib*と同様に実験した。

その結果、*Lib*については、タバコやタルウマゴヤシにおいても転移能を持つこと、また、*Rtsp-1*とEM配列については、サリチル酸などのストレス処理により、形質転換体において転移誘導が行える可能性があり、これらの活動型LTR-RTNsについても「正の遺伝学」の道具としての可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

本学位論文の研究では、「動く遺伝子」と呼ばれるレトロトランスポゾンについて、活動型の配列を利用することにより、1) アズキの品種を識別するDNAマーカーの開発、2) レトロトランスポゾンの転移誘導による遺伝子機能同定法の開発に取り組んだ。

アズキ品種識別マーカーの研究では、アズキのゲノムからレトロトランスポゾン配列を網羅的に単離し、転写活性の調査などにより活動型の配列の選別を進めた。選別した配列について、DNAサブトラクション法によりマーカー開発が必要な品種「きたのおとめ」に高度に特異的な挿入部位を同定した。この挿入部位は、北海道立農業試験場が保有する国内外のアズキ遺伝資源などでの調査から品種固有マーカーとして、極めて実用性が高いことが分かった。なお、この研究成果の発表により、DNA多型学会2007年度の優秀研究賞を受賞した。

遺伝子機能同定法の開発については、サツマイモの活動型レトロトランスポゾン*Llb*を遺伝子組換えによってタバコとタルウマゴヤシに導入し、*Llb*を茎頂培養で転移させて、表現型の変異と*Llb*の転移が直結する「正の遺伝学」解析手法の確立を目指した。また、サツマイモの活動型レトロトランスポゾンである *Rtsp-1* とEM配列についても遺伝子組換えを行い、転移誘導条件の解明を進めた。その結果、*Llb*については、タバコやタルウマゴヤシにおいても転移能を持つこと、また、*Rtsp-1* とEM配列については、サリチル酸などのストレス処理により、形質転換体において転移誘導が行える可能性があり、これらの活動型レトロトランスポゾンは「正の遺伝学」の道具として利用できる可能性を示唆した。なお、この研究課題の提案により、日本学術振興会特別研究員（DC2）に採用されている。

以上のことから、本学位審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位に充分値するものと判定した。